

肝細胞移植における簡便で有用な移植前グラフト評価法の確立

著者	松村 宗幸
号	87
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3791号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00124203

氏名	まつむら　むねゆき 松村　宗幸
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	平成30年3月27日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程)医科学専攻
学位論文題目	肝細胞移植における簡便で有用な移植前グラフト評価法の確立
論文審査委員	主査　教授　亀井　尚 教授　井樋　栄二 教授　木村　芳孝

論文内容要旨

【研究背景】肝細胞移植において、移植前グラフト評価法は確立されていない。一方、同じ細胞移植である脾臓移植においては、脾臓のADP/ATP比が移植成績に相関し、有用な移植前評価法となることが報告されているが、肝細胞移植に対する有効性は未だ検証されていない。そこで今回、移植肝細胞の生着効率を予測できる有用な評価法確立を目的とし、現行の*in vitro*評価法にADP/ATP比の計測を加え、無アルブミン血症モデル動物を用いて肝細胞の移植結果との相関性を検証した。

【研究方法】肝細胞のドナーとしてF344ラットを使用した。まず、肝細胞懸濁液を60℃の温浴槽にて2分または3.5分熱し、ネクローシスモデルを作成し、trypan blue exclusion (TBE)による生存率とADP/ATP比の相関を検証した。次に、肝細胞のアポトーシスモデルを作成した。肝細胞を100 nmol/L オカダ酸(Okadaic acid: OA)と1%dimethylsulfoxide (DMSO)添加培地中で培養してアポトーシスを誘導した肝細胞をOA群、1%DMSO添加培地で培養した肝細胞を対照群とした。OA群、対照群におけるアポトーシス細胞の割合を、TUNEL染色とフローサイトメトリーによるAnnexinV解析により確認した。現行の*in vitro*評価法であるTBE、plating efficiency (PE)、DNA定量、アンモニア除去試験に加え、分離肝細胞のADP/ATP比を計測した。その上でOA群、対照群の肝細胞を無アルブミンラットの門脈に移植し、移植第0、14、28日の血清アルブミン濃度の測定と、移植第28日のレシピエント肝のアルブミン染色とTUNEL染色を実施することにより、グラフトの生着率を評価した。

【研究結果】ネクローシスモデルでは、ADP/ATP比はTBEによる生存率と強い負の相関を認めた($R^2=0.559$, $P<0.001$)。しかし、TBEによる生存率が60%以上の肝細胞では、ADP/ATP比が常に0.12未満であり、相関関係は認めなかった($R^2=0.178$, $P=0.17$)。アポトーシスモデルのTUNEL陽性細胞の割合と、Annexin V+/7-AAD-の細胞の割合は、OA群が対照群よりも有意に高値であったことから($P<0.001$, $P<0.001$)、肝細胞のアポトーシス誘導モデルの有効性が確認された。TBEによる生存率では、OA群と対照群の差を検出できなかったが($P=0.582$)、ADP/ATP比はOA群が対照群よりも有意に高値となり($P<0.001$)、肝細胞のアポトーシスを反映する有用な検査法であることが明らかとなった。PE、DNA定量、およびアンモニア除去試験の1時間値においても、OA群と対照群で有意な差が認められた(それぞれ $P<0.001$)。肝細胞移植実験における血清アルブミン濃度は、OA群が対照群よりも有意に低値を示した($P<0.001$)。

【結論】ADP/ATP 比、PE、DNA 定量、アンモニア除去試験（1 時間値のみ）と移植結果に相関性が認められたことから、これらの *in vitro* 評価法が肝細胞移植の生着効率を予測する有用な評価方法であることが示された。しかし、臨床の肝細胞移植では、肝細胞分離後、迅速に移植を行うことが想定されるため、検査に多大な時間を要する PE と DNA 定量は、移植前評価よりも実験用途に適した遡及的な評価法であると考えられる。本研究により ADP/ATP 比単独、または ADP/ATP 比と短期の薬物代謝試験を組み合わせることにより、効果的な肝細胞の移植前評価法となり得ることが示唆された。

審査結果の要旨

博士論文題目肝細胞移植における簡便で有用な移植前グラフト評価法の確立.....

所属専攻・分野名医科学専攻先進外科学.....分野.....

学籍番号B4MD5121.....氏名 松村 宗幸.....

肝細胞移植は、急性肝不全、代謝性肝疾患といった致死性の肝疾患に対する治療法であり、ドナー不足という問題の解決が未だみられない本邦において、今後画期的な治療法となる可能性を有している。しかし、問題点は山積しており、臨床応用には至っていない。

肝細胞移植において、移植前細胞評価法は確立されていない。臨床現場において、トリパンプルー排除試験が行われるが、術後の生着と相関しないと報告されている。筆者は、同じ細胞移植である脾臓移植における術前評価法として既に確立された ADP/ATP 比の測定が、肝細胞移植前評価法においても有用であるという仮説の元に本研究を行った。

F344 ラットより分離された肝細胞を用い、60℃の恒温槽で熱するネクロシスモデルとアポトーシス誘導薬剤であるオカダ酸で培養を行ったアポトーシスモデルを作成した。それぞれのモデルに対して、トリパンプルー排除試験と ADP/ATP 比を測定し比較検討を行った。ネクロシスモデルにおいては、トリパンプルー排除試験が ADP/ATP 比の測定と比べてより有用であったが、アポトーシスモデルにおいては、ADP/ATP 比の測定がトリパンプルー排除試験と比べてより有用であると判明した。さらにアポトーシスモデルを用い、*in vitro* の細胞評価法である、Plating efficiency、DNA 測定、アンモニア除去試験を行い、長時間かかるものの、各測定法もアポトーシスの評価に有用であることが判明した。無アルブミンラットを用いた、肝細胞移植実験においても、臨床現場において頻用されるトリパンプルー排除試験は移植結果を予測できないが、ADP/ATP 比、Plating efficiency、DNA 測定、アンモニア除去試験は移植結果を予測可能であることが判明した。

臨床現場においては、肝細胞の脆弱性を考慮すると短時間で移植の可否を決定することが必要である。本研究において、*in vitro* の細胞評価法である Plating efficiency、DNA 測定、アンモニア除去試験もそれぞれ有用であることは示唆されたものの、測定時間の関係から臨床応用は難しいと考えられる。それに対して、新規肝細胞評価法である ADP/ATP 比の測定は、短時間で客観的に移植の可否を決定できると考えられ、肝細胞移植における術前評価法として理想的である。トリパンプルー排除試験と ADP/ATP 比を組み合わせ、肝細胞移植術前評価を行うことにより、移植成績の改善に寄与することが示唆された。よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。